

[文章编号] 1000-1182(2009)06-0676-05

一氧化氮合酶 在犬下颌骨牵张成骨过程中的表达和意义

周诺 廖妮 韦山良 梁飞新

(广西医科大学口腔医院 口腔颌面外科, 广西 南宁 530021)

[摘要] 目的 研究一氧化氮合酶(NOS)在犬下颌骨牵张成骨及骨创伤修复过程的表达和意义。方法 28只犬随机分成牵张组和直接延长组各12只及正常对照组4只,用免疫组化法检测牵张第6天、牵张后固定2周和8周NOS表达水平的变化。结果 牵张第6天牵张组可见牵开区组织内炎性细胞浸润,血管周围和间质内较多红细胞漏出。牵张及固定早期,牵张组和直接延长组诱导型NOS(iNOS)与内皮型NOS(eNOS)阳性表达均明显高于正常对照组,直接延长组的iNOS和eNOS阳性表达低于牵张组,差异均有统计学意义($P<0.05$);牵张后固定8周iNOS和eNOS阳性表达3组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 NOS在牵张早期表达升高,结合在牵张早期组织内红细胞漏出,提示牵张成骨过程中存在某种程度的微创伤,这种微创伤可能是牵张成骨的重要启动因素之一。

[关键词] 牵张成骨; 一氧化氮合酶; 创伤

[中图分类号] R 782.2 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2009.06.025

Expression and significance of nitric oxide synthase in mandibular distraction osteogenesis of canine ZHOU Nuo, LIAO Ni, WEI Shan-liang, LIANG Fei-xin. (Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Stomatology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression and significance of nitric oxide synthase(NOS) during mandibular distraction osteogenesis and bone trauma healing, to further study the mechanism of distraction osteogenesis. **Methods** Twenty-eight adult dogs were randomly divided into DO group(12 dogs), acutely lengthening group(12 dogs) and control group(4 dogs). Immunohistochemical examination were carried out to test the expression of NOS during the sixth day in distraction period, the second and eighth week of consolidation. **Results** In DO group infiltration of inflammatory cell was found in the distraction gap, more red blood cells(RBC) leak out around vasculum and matrix in the sixth day in distraction period. The expression of local iNOS(inducible NOS) and eNOS(endothelial NOS) in DO group and acutely lengthening group was higher than that in the control group($P<0.05$), the expression of local iNOS and eNOS in acutely lengthening group was lower than that in DO group($P<0.05$) in the early of distraction period and the consolidation. The expression of local iNOS and eNOS was no statistic difference between three groups($P>0.05$) in the eighth week of consolidation. **Conclusion** NOS as a sensitive index of tissue trauma are highly expressed, and RBC was found leaking out in the early of distraction, indicating that micro-trauma to some extent may occur during DO procedure, the micro-trauma may be one of the significant factors which increasing regeneration of bone during DO.

[Key words] distraction osteogenesis; nitric oxide synthase; trauma

牵张成骨术(distraction osteogenesis, DO)是利用骨创伤愈合机制产生新骨的一项内源性组织工程技术^[1]。多数学者认为DO的过程,是经过一系列复

杂的细胞和分子生物学行为完成的,然而,组织细胞将受到的机械应力刺激转导为细胞内生化信号的机制,目前尚未完全明确。本课题组在前期实验^[2-3]中发现,在牵张前期,无论是牵张组还是直接延长组多种细胞生长因子的表达均明显升高,这一现象与骨折修复早期其他文献报道相似^[4-5],因此推测创伤极有可能是牵张成骨重要的启动因素之一。本研究利用早期已经建立的犬双侧下颌骨牵张成骨动物模型,采用免疫组化法检测损伤敏感指标一氧化氮

[收稿日期] 2008-09-28; [修回日期] 2009-07-04
[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30760273); 广西自然科学基金资助项目(桂科基0448058); 广西“新世纪百千万人才工程”专项资金资助项目(2004223)
[作者简介] 周诺(1960—),男,广西人,教授,博士
[通讯作者] 周诺, Tel: 0771-5358645

合酶(nitric oxide synthase, NOS)在牵张成骨及骨创伤修复过程中的表达和变化规律。

1 材料和方法

1.1 主要材料

广西区实验动物中心提供的健康杂种犬28只,雌雄不限,年龄1.5~2岁,体重10~15 kg。自制牵张器,DMR+Q550型病理图像分析系统(Leica公司,德国),BX40显微镜(Olympus公司,日本)。诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)和内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)多克隆犬抗、即用型Ultra Sensitive™ S-P试剂盒等(均购自福州迈新生物技术有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组 将28只犬随机分成3组:牵张组12只,直接延长组12只,正常对照组4只。

1.2.2 手术方法 参照参考文献[6]。

1.2.3 标本获取与处理 所有动物处死后取牙槽嵴下部分骨组织标本用10%中性甲醛固定24 h后,置于10%的EDTA脱钙液进行脱钙,乙醇脱水,二甲苯透明、浸蜡、石蜡包埋,切成3~5 μm厚的连续切片,行苏木精-伊红染色。

1.2.4 免疫组化染色及结果分析 将上述切片用免疫组化SP法检测双下颌牵张区新生组织中iNOS和eNOS的含量。多克隆抗体工作浓度为1:100,按说明书要求进行免疫组化染色,用公司提供的阳性片作阳性对照,用PBS代替一抗作为阴性对照。在光学显微镜下观察免疫组化结果,以组织内出现棕黄色颗粒代表NOS的阳性信号。采用Leica DMR+Q550型病理图像分析仪对染色阳性强度进行灰度分析,灰度值:0(黑)~255(白),染色越深,灰度值越低。

1.3 统计分析

用SPSS 13.0统计分析系统进行t检验和方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

实验犬在实验过程中全部存活,伤口无感染(图1),牵张器固定牢固,无断裂和变形,牵张区域无红肿、渗出、破溃,产生并维持了所需的牵张距离(图2)。

2.2 组织学观察

牵张第6天牵张组牵开区细胞水肿变形,细胞间隙增宽,大量毛细血管增生,扩张充血,血管周围和间质内较多红细胞及血小板漏出,伴炎性细胞浸润(图3、4),牵张间隙中可见成纤维细胞及胶原

纤维出现沿牵引方向排列的趋势;直接延长组拉开间隙内为肉芽组织所充满,大量炎性细胞浸润,仅见少量毛细血管增生,两侧骨断端也可见少量新生骨小梁,但排列紊乱。牵张固定期,骨小梁逐渐成熟,牵张组2侧骨断端及骨膜下可见大量沿牵张方向排列的新生骨小梁,直接延长组拉开区可见局灶性新生软骨和少量编织骨形成,但中间仍由大量纤维结缔组织连接。



图1 术后实验犬伤口无感染

Fig 1 The experimental dog hadn't any infection after operation

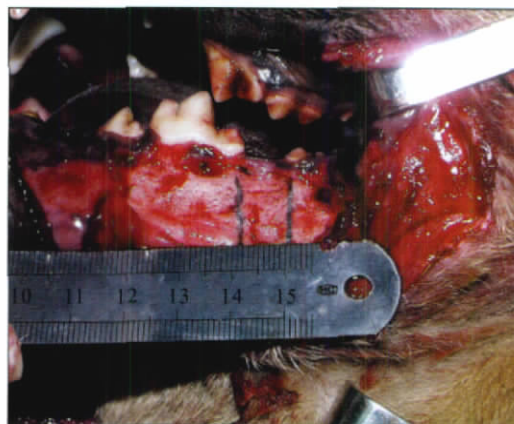


图2 双侧下颌骨成功延长10 mm,牵张区形成钙化良好的新骨

Fig 2 Bilateral mandible was successfully lengthened 10 mm, and new bone was seen between DO gaps

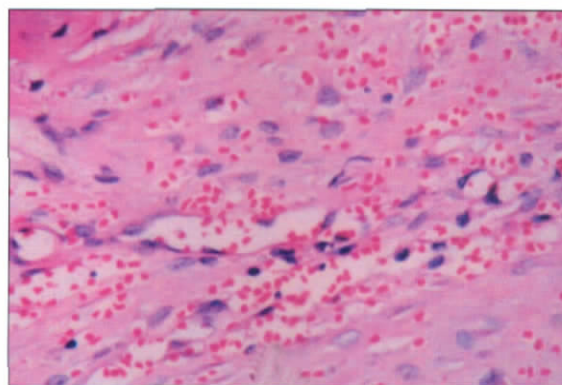


图3 牵张第6天,牵张区细胞水肿变形,大量毛细血管增生,间质内较多红细胞漏出 SP ×400

Fig 3 In DO group at the 6th day, the cell edema and generous micrangium hyperplasy, more red blood cells leak out around matrix SP ×400

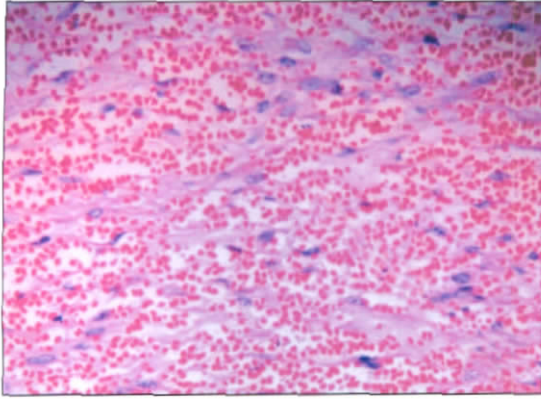


图4 牵张第6天, 牵张区见大量红细胞和血小板漏出, 伴炎性细胞浸润 SP ×100

Fig 4 In DO group at the 6th day, more red blood cells and thrombocyte leak out, inflammatory cell was found between DO gaps SP ×100

2.3 免疫组化观察

2.3.1 iNOS的表达 牵张第6天iNOS表达见图5、6。

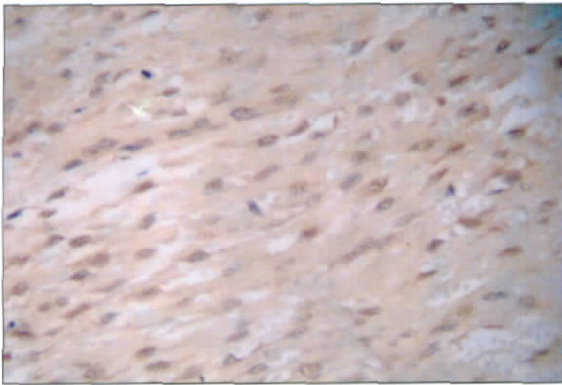


图5 牵张第6天, 牵张区边缘活跃的间充质细胞、成纤维细胞和成骨细胞可见iNOS强阳性染色 SP ×400

Fig 5 In DO group at the 6th day, intense positive staining of iNOS was localized on mesenchymal cell, fibroblast and osteoblast SP ×400

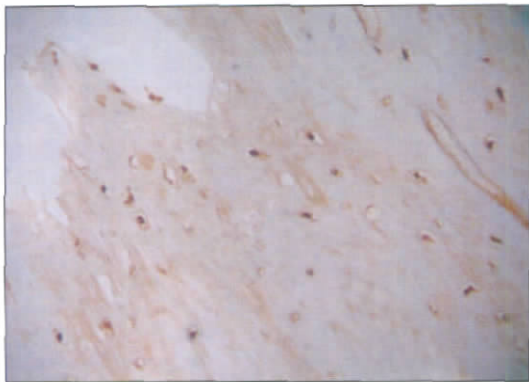


图6 牵张第6天, 直接延长组骨断端附近的成骨细胞和少量血管内皮细胞iNOS阳性染色 SP ×400

Fig 6 At the 6th day of acutely lengthening group positive staining of iNOS was localized on osteoblast and vascular endothelial cell SP ×400

牵张组在新生骨小梁边缘的间充质细胞、成纤维细胞和成骨细胞中有强阳性染色, 定位于细胞质和少量细胞核; 直接延长组在拉开间隙内的成纤维

细胞、成骨细胞和少量血管内皮细胞有阳性染色。

牵张组iNOS的平均灰度值低于正常对照组, 差异有统计学意义($P<0.01$), 直接延长组iNOS平均灰度值低于正常对照组, 但高于牵张组, 差异均有统计学意义($P<0.05$); 牵张后固定2周, 牵张组和直接延长组iNOS的平均灰度值均升高, 但仍低于正常对照组($P<0.05$), 牵张组的平均灰度值低于直接延长组, 差异有统计学意义($P<0.05$); 牵张后固定8周iNOS的平均灰度值逐渐升高, 3组间比较差异无统计学意义($P>0.05$, 表1)。

表1 各实验组不同时期iNOS表达的平均灰度值($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Expression of iNOS in different groups at different times($\bar{x}\pm s$)

时间	n	牵张组	直接延长组	P值
牵张第6天	8	92.215±2.017*	113.317±2.159#	<0.05
牵张后固定2周	8	112.058±3.015*	120.423±3.561#	<0.05
牵张后固定8周	8	134.361±4.162	139.025±4.721	
正常对照组	4	143.518±5.103		

注: 与正常对照组比较, * $P<0.01$, # $P<0.05$ 。

2.3.2 eNOS的表达 牵张第6天, 牵张组在骨断端骨小梁边缘的血管内皮细胞、间充质细胞以及少量的成骨细胞中有eNOS阳性染色, 着色定位于细胞质; 直接延长组拉开间隙内的血管内皮细胞和成纤维细胞出现eNOS阳性染色。牵张组与直接延长组eNOS的平均灰度值均低于正常对照组($P<0.05$), 且牵张组的平均灰度值低于直接延长组, 差异有统计学意义($P<0.05$); 牵张后固定2周牵张组eNOS的平均灰度值明显低于正常对照组, 差异有统计学意义($P<0.01$), 且牵张组eNOS平均灰度值低于直接延长组, 差异有统计学意义($P<0.05$)(图7、8); 牵张后固定8周eNOS的平均灰度值逐渐升高, 3组间比较差异无统计学意义($P>0.05$, 表2)。

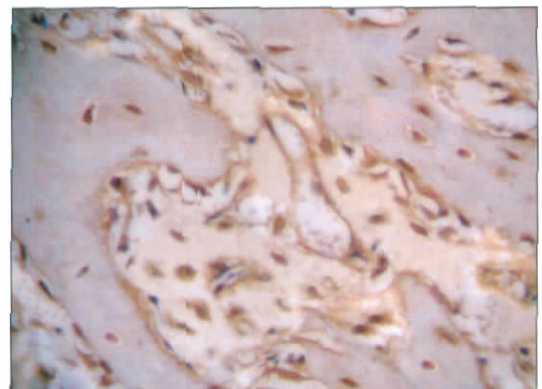


图7 牵张后固定2周, 牵张区边缘的血管内皮细胞、成纤维细胞和成骨细胞有eNOS强阳性染色 SP ×400

Fig 7 In the 2nd week, intense positive staining of eNOS was localized on vascular endothelial cell, fibroblast and osteoblast in DO group SP ×400

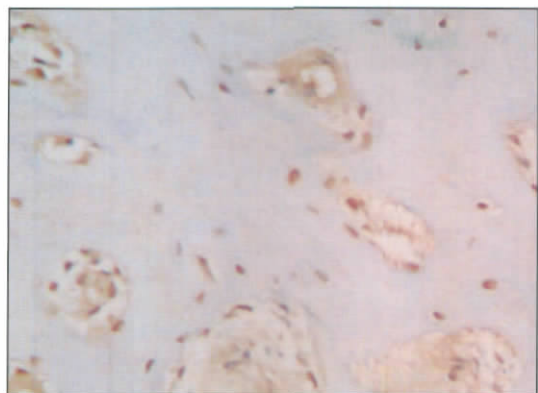


图8 牵张后固定2周,直接延长组血管内皮细胞、成纤维细胞和成骨细胞中eNOS弱阳性染色 SP ×400

Fig 8 In the 2nd week, positive staining of eNOS was weakened on vascular endothelial cell, fibroblast and osteoblast in acutely lengthening group SP ×400

表2 各实验组不同时期eNOS表达的平均灰度值($\bar{x} \pm s$)
Tab 2 Expression of eNOS in different groups at different times($\bar{x} \pm s$)

时间	n	牵张组	直接延长组	P值
牵张第6天	8	110.327±3.471 [#]	123.268±3.357 [#]	<0.05
牵张后固定2周	8	98.321±4.175 [*]	127.025±4.027 [#]	<0.05
牵张后固定8周	8	137.358±4.065	140.142±3.817	
正常对照组	4	147.273±5.843		

注:与正常对照组比较,*P<0.01,#P<0.05。

3 讨论

目前多数研究认为牵张产生的张应力是促进新骨形成的主要因素。Ilizarov^[7]称骨的形状和大小受局部骨的血供和张应力的影响,血供增加,张应力增加致骨量增加。近年来的分子生物学研究提示某些生长和分化因子的级联反应参与了促进骨形成和血管形成的作用。然而,目前仍不知道在牵张过程中产生的机械应力是如何激活机体产生相应的生物学信号,牵张成骨的生物学机制尚未完全明了。

本课题组前期研究发现,在DO和骨缺损修复早期,参与组织再生的多种细胞生长因子的表达普遍升高,这与多数学者关于骨折修复早期的研究结果相似^[4-5],他们认为:骨折、骨截开术等可导致骨基质中多种生长因子被激活,并从骨基质中溶解释放出来。同样,在DO早期,多种细胞生长因子及细胞外胶原基质明显升高,表明DO与骨折在骨组织修复再生过程中可能具有相同的细胞分子生物学基础,创伤极有可能是牵张成骨重要的启动因素之一。

许多研究发现NO和NOS与创伤密切相关,可作为组织损伤早期的敏感指标之一。NO是左旋精氨酸与氧分子在NOS催化作用下的产物,是细胞内外的

重要生物信使分子,参与多种生理病理过程。NOS是体内合成NO的关键酶,在生理状况下处于低水平表达,在创伤或其他诱导剂的作用下,可被诱导生成这类酶,并持续合成NO^[8]。Zhu等^[9]研究发现,鼠骨折4 d后3种NOS mRNA表达均明显增加。张明等^[10]用撞击机撞击兔建立颌面部创伤动物模型,检测伤区NO含量,结果显示伤后6 h伤区局部NO含量显著升高,说明NO的生成与组织损伤程度一致。

关于NO和NOS在牵张成骨中的研究,目前国内外报道甚少。国外学者^[11]发现牵张成骨过程中新骨形成与三叉神经NOS的表达呈显著相关关系,提示NOS可能通过神经性途径在骨愈合过程中起到重要的作用。张志纯等^[12]利用种植型牵张器增高下颌牙槽嵴,观察成骨过程中NOS的表达,结果发现iNOS和eNOS在DO过程的不同时期具有不同的表达,提示可能对DO的新骨形成起到一定的调节作用。

本研究结果显示,牵张早期牵张组牵开区iNOS与eNOS的表达显著高于正常对照组,且明显高于直接延长组,牵张固定早期2实验组iNOS与eNOS的表达逐渐下降,而牵张组iNOS与eNOS的表达仍明显高于直接延长组。笔者认为,NOS作为组织损伤早期的敏感标志,2实验组在截骨术后早期NOS表达的升高极有可能是骨组织创伤的一种表现,结合组织学检查发现牵张第6天牵张组牵开区细胞水肿变形,细胞间隙增宽,大量毛细血管增生,扩张充血,血管周围和间质内较多红细胞和血小板漏出,伴炎性细胞浸润,更进一步表明牵张区组织存在微创伤现象。这种微创伤是在牵张过程中产生的,在一定速率和频率的机械牵张力的作用下,愈合过程中的纤维性骨痂发生一定程度的多次微小创伤,导致NOS及其他各种具有促进成骨作用的生物活性物质的释放不断累加升高,并维持一定浓度,持续调控新骨形成;而直接延长组的生物活性物质只在早期有一过性高表达,表现为一过性的调控新骨形成。所以,直接延长组除在早期有新骨形成外,其后则无新骨形成,而以纤维瘢痕组织取而代之。

笔者认为,DO所产生的微创伤可能通过以下几个机制对牵张成骨发生作用:1)牵张创伤使细胞膜发生机械形变,改变离子通透性,激活细胞间的第二信使,引起离子和分子的跨膜转运改变,通过细胞的上游信号转导机制的激活而诱发体内瀑布式激酶激活反应。2)牵张创伤所致的组织损伤使得血管破坏,血液成分进入组织间隙,炎症细胞浸润,启动细胞水平的链式阶梯反应,分泌多种生物活性物质,如蛋白水解酶、酶抑制剂、胞外基质蛋白、化学诱导剂或生长因子,它们影响着间充质细胞的合

成、分化、增殖能力和这些细胞在血管生成及新骨形成的作用。3)牵张创伤导致局部进行性缺血、缺氧、能量代谢障碍等,结果导致氧耗增加,出现局部低氧环境,低氧张力强烈诱导血管内皮生长因子和成纤维细胞生长因子表达,进而诱导形成大量的新生血管。4)牵张创伤可能引起全身反应,刺激内分泌活动,促进生长激素和其他生长因子的释放,进一步促进成骨。

因此,牵张成骨是通过一系列复杂的细胞和分子生物学行为实现的内源性骨组织工程,而DO的这一细胞和分子生物学行为也许并非单纯机械牵张力直接作用的结果,牵张造成的微创伤有可能是DO重要的启动因素之一,是机械牵张力与各种具有促进成骨作用的生物活性物质释放的重要中介。当然,这种微创伤是有一定生理限度的,必须在机体所能承受并能诱发机体产生修复反应的极限之内,超过这一极限,可能造成机体不可修复的创伤,导致骨不连或延迟愈合。这也进一步证实了众多学者所认可的每天1 mm的牵张速率是较为安全和理想的牵张速率^[13-14],而直接延长组将下颌骨截断后直接拉开1 cm,所形成的创伤超出了机体的生理限度和成骨反应能力,导致成骨不良。

[参考文献]

[1] Klein C, Howaldt HP. Lengthening of the hypoplastic mandible by gradual distraction in childhood—a preliminary report[J]. J Craniomaxillofac Surg, 1995, 23(2) 68-74.

[2] 周诺, 麦华明, 梁飞新, 等. BMP2、bFGF在牵张成骨中的表达和意义[J]. 口腔医学研究, 2004, 20(5) 465-468.
ZHOU Nuo, MAI Hua-ming, LIANG Fei-xin, et al. The expression and biologic effect of BMP2 and bFGF during mandibular distraction osteogenesis[J]. J Oral Sci Res, 2004, 20(5) 465-468.

[3] 周诺, 赵亮, 梁飞新, 等. VEGF、IGF-1在下颌骨牵张成骨与骨缺损修复中的表达和作用[J]. 口腔医学, 2005, 25(5) 260-263.
ZHOU Nuo, ZHAO Liang, LIANG Fei-xin, et al. Expression and effects of VEGF, IGF-1 on mandibular distraction osteogenesis and bone defect[J]. Stomatology, 2005, 25(5) 260-263.

[4] Spector JA, Luchs JS, Mehara BJ, et al. Expression of bone morphogenetic proteins during membranous bone healing[J]. Plast Reconstr Surg, 2001, 107(1) 124-134.

[5] Steinbrech DS, Mehrara BJ, Rowe NM, et al. Gene expression of

TGF-β, TGF-β receptor, and extracellular matrix proteins during membranous bone healing in rats[J]. Plast Reconstr Surg, 2000, 105(6) 2028-2038.

[6] 周诺, 梁飞新, 韦山良, 等. TGF-β1在下颌骨牵张成骨中的局部表达及作用的实验研究[J]. 实用口腔医学杂志, 2004, 20(6) : 670-673.
ZHOU Nuo, LIANG Fei-xin, WEI Shan-liang, et al. Expression of TGF-β1 in mandibular distraction osteogenesis[J]. J Pract Stomatol, 2004, 20(6) 670-673.

[7] Ilizarov GA. The tension-tress effect on the genesis and growth of tissue. Part . The influence of stability of fixation and soft-tissue preservation[J]. Clin Orthop Relat Res, 1989 (238) 249-281.

[8] Ogawa T, Nussler AK, Tuamer E, et al. Inhibition of nitric oxide synthase does not influence urinary nitrite plus nitrate excretion after renalischemic injury[J]. Langenbecks Arch Surg, 2002, 386(7) 518-524.

[9] Zhu W, Murrell GA, Lin J, et al. Localization of nitric oxide synthase during fracture healing[J]. J Bone Miner Res, 2002, 17(8) :1470-1474.

[10] 张明, 何黎升, 薄斌, 等. 一氧化氮在颌面部撞击伤中病理作用的实验研究[J]. 口腔颌面外科杂志, 2003, 13(1) 8-10.
ZHANG Ming, HE Li-sheng, BO Bin, et al. Study on the role of nitric oxide in maxillofacial impact injury[J]. J Oral Maxillofac Surg, 2003, 13(1) 8-10.

[11] de Albuquerque RF Jr, Aparecida Del Bel E, Brentegani LG, et al. Trigeminal nitric oxide synthase expression correlates with new bone formation during distraction osteogenesis[J]. Calcif Tissue Int, 2008, 82(4) 309-315.

[12] 张志纯, 刘启明, 李曦光. 一氧化氮合酶在兔下颌骨牵张成骨过程中的表达[J]. 中国口腔颌面外科杂志, 2007, 5(1) 61-65.
ZHANG Zhi-chun, LIU Qi-ming, LI Xi-guang. Expression of NOS in distracted rabbit mandibular alveolar ridge[J]. Chin J Oral Maxillofac Surg, 2007, 5(1) 61-65.

[13] 唐正龙, 邹淑娟, 胡静, 等. 不同速率牵张山羊下颌后下齿槽血管变化与血管生成的实验研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2002, 20(3) 203-205.
TANG Zheng-long, ZOU Shu-juan, HU Jing, et al. Changes in the inferior alveolar vessels and angiogenesis following mandibular lengthening with different rates of distraction[J]. West China J Stomatol, 2002, 20(3) 203-205.

[14] 李继华, 胡静, 王大章, 等. 不同牵张速率对下颌骨延长后新骨生成的影响[J]. 口腔医学纵横, 2001, 17(4) 262-264.
LI Ji-hua, HU Jing, WANG Da-zhang, et al. Effects of distraction rates on bone regeneration after mandibular osteodistraction[J]. J Comprehensive Stomatol, 2001, 17(4) 262-264.

(本文编辑 汤亚玲)